

## COMMENTATED REVIEW

GLP-1 RECEPTOR GENE "KNOCKOUT" CAUSES GLUCOSE INTOLERANCE,  
BUT NO DISRUPTION OF EATING BEHAVIOR

5

GALLWITZ, B., AND SCHMIDT, W.E.

SOURCE: Z. Gastroenterol. 1997; 35: 655-658

Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like

10 peptide 1 receptor gene

Scrocchi, LA, Brown, TJ, MacLusky, N, Brubaker, PL, Auerbach, AB, Joyner, AL,  
Drucker, DJ.

15 Nature Medicine 1996; 2: 1254-8

#### SUMMARY

The gastrointestinal hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) stimulates postprandial insulin secretion (*Kreymann B et al. Lancet 1987; ii: 1300-4*). In patients 20 with type II diabetes mellitus, exogenous doses of GLP-1 improve postprandial glucose metabolism (*Nauch MA et al. Diabetologia 1993; 36: 741-4*). Further, according to more recent studies, GLP-1 appears to play an important role as a central mediator for satiety (*Turton MD et al. Nature 1996; 379: 69-72*). However, since all other peptides influence insulin secretion and satiety behavior, the relative importance of GLP-1 as a 25 physiological stimulator of insulin secretion and as a central mediator of feeding behavior was investigated by the research group of *Drucker* in the present study on a mouse model with a missing GLP-1 receptor.

Mice were first bred with the targeted exclusion of the GLP-1 receptor gene (GLP-1 receptor "knockout" GLP-1R<sup>-/-</sup>). For this purpose, a targeting vector was 30 constructed, which replaces different exons of the GLP-1 receptor. The genomic DNA of the transgenic animals showed a complete exclusion of the GLP-1 receptor gene. The

recombinant GLP-1R<sup>-/-</sup> allele obtained in this way was reproduced with the expected frequency according to Mendel's law in the next generation, and thus GLP-1<sup>-/-</sup> mutants could be bred. These mice are viable, develop normally, and phenotypically appear to be completely unremarkable. mRNA transcripts of the GLP-1 receptor were not found in  
5 the pancreas, hypothalamus and lungs, where the GLP-1 receptor is expressed to a great extent in normal animals. The histological structure of these organs was completely unremarkable.

*Address of the commentators: Prof. B. Gallwitz, M.D., W. E. Schmidt, M.D., First  
10 Medical Clinic of the Christian Albrecht University of Kiel, Schittenhelmstr. 12, 24105  
Kiel*

Oral glucose tolerance tests were conducted in male and female GLP-1R<sup>-/-</sup> mice in order to investigate the importance of GLP-1 for the regulation of the blood sugar level. A pathological glucose tolerance with elevated blood glucose levels was found in  
15 these mice postprandially up to two hours after the beginning of the test in the oral glucose tolerance test. The fasting glucose levels were also elevated in most of the mice. The disturbance in glucose tolerance was more pronounced in the male animals than in the females.

When serum insulin concentrations were measured simultaneously, the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice showed comparable fasting values when compared with the control animals. Thirty minutes after oral ingestion of glucose, the serum insulin concentration, however, was reduced by approximately one-third in the knockout animals. The values after one hour were again equal in the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice and the controls. The parallelly measured glucagon levels were the same in both groups of animals during the oral glucose  
25 tolerance test.

In order to show that GLP-1 decisively participates in the regulation of the blood glucose concentration, glucose was also administered intraperitoneally to normal mice and GLP-1R<sup>-/-</sup> mice. With this route of glucose introduction, the transgenic animals also showed a pathological glucose tolerance. In the male animals, the glucose intolerance  
30 was more pronounced than in the oral glucose tolerance test.

As a control test to determine that the biological effects of GLP-1 are not mediated by other receptors, a third test series was conducted in which oral glucose tolerance tests were carried out with the simultaneous administration of pharmacological doses of 100 µg of GLP-1. In this case, the elevation of blood sugar could be suppressed 5 in the normal control animals by exogenous GLP-1 administration in the oral glucose tolerance test. The administration of GLP-1 had no effect on blood sugar in the GLP-1<sup>-/-</sup> mice.

Since the research team of Bloom (*Turton MD et al. Nature* 1996; 379: 69-72) had recently postulated that GLP-1 is an important regulator of satiety in the CNS, the eating 10 behavior of GLP-1R<sup>-/-</sup> mice was investigated under various conditions. Over a time period of 24 weeks, the body weight in these animals was identical to that of normal controls, which indicated that under normal conditions, GLP-1 certainly does not have a dominant role in the regulation of body weight. In the case of fasting animals, no difference was found in the quantity of food ingested. Thus, the absence of the GLP-1 15 receptor leads neither to a change in the body weight nor to a change in eating behavior. Intracerebroventricular (icv) administration of 5 µg of GLP-1, which prevents the ingestion of feed in normal animals, had no effect in the case of GLP-1R<sup>-/-</sup> mice. Autoradiographs with <sup>125</sup>I-GLP-1 showed that the transgenic mice do not express 20 GLP-1 receptors. Thus it was shown that pancreatic and central GLP-1 receptors are structurally identical and are coded by the same gene.

From their experiments, the authors conclude that GLP-1 is a physiologically important endocrine hormone and thus decisively contributes to postprandial stimulation of insulin secretion. From tests in which glucose was given intraperitoneally, it results 25 that GLP-1, independently of the route of introduction, decisively regulates glucose homeostasis, possibly by stimulating peripheral glucose utilization. The role of GLP-1 as a central regulator of satiety appears to be less important than the peripheral effect of GLP-1 as a stimulator of insulin secretion. In the opinion of the authors, the experiments underscore the importance of GLP-1 as a physiological regulator of the blood sugar level. They therefore see possibilities of utilizing GLP-1 therapeutically in future in the 30 treatment of diabetes.

## COMMENTARY

In the beginning of the 90's, due to new molecular genetic methods, it was possible to breed animal models with specifically excluded genes (*Tybulewicz V et al. Cell* 1991; 65: 1153-63; *Nagy A et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8424-8; *Nagy A, Rossant J. In: Gene targeting: A practical approach, Joyner AL* (ed.). Oxford, Oxford Univ Press 1993; 147-78; *Wurst W, Joyner AL. In: Gene targeting: A practical approach. Joyner AL* (eds.). Oxford, Oxford Univ Press 1993; 33-61). These so-called "knockout" mutants have since then become important *in-vivo* models for investigation in order to examine the consequences of the absence of a protein on the organism. Since highly specific ligands with exclusive receptor antagonistic activity are still not available for many hormone receptors, animals are increasingly bred with targeted excluded receptor genes. Several "knockout" constructs, however, lead to lethal mutations, so that this technique is limited. In the present study, the research group of Drucker has been successful for the first time in breeding a mice mutant which does not possess a pancreatic GLP-1 receptor. They could further show that this type of GLP-1 receptor mediates all the important biological functions of GLP-1 peripherally and in the CNS. This mouse mutant not only has an unremarkable phenotype, but it also develops normally and is fully viable. It is thus excellently suitable as an animal model for a complete GLP-1 resistance, which is brought about by an absence of the GLP-1 receptor.

Up until now, only the exendin fragment exendin (9-39) (*Göke R et al. J Biol Chem* 1993; 268: 19650-5; *Thorens B et al. Diabetes* 1993; 42: 1678-82; *Kolligs F et al. Diabetes* 1995; 44: 16-9) could be used as a GLP-1 receptor antagonist, but this also acts as an antagonist to the receptor for gastric inhibitory polypeptide (GIP) (*Gremlich S et al. Diabetes* 1995; 44: 1202-8). Since GIP also stimulates postprandial insulin secretion (*Creutzfeldt W. Diabetologia* 1979; 16: 75-85; *Creutzfeldt W, Ebert R. Diabetologia* 1985; 28: 565-73; *Creutzfeldt W, Ebert R. In: The exocrine pancreas: Biology, pathobiology and disease. Go VI et al. (eds). New York, Raven Press 1986; 333-46*), no exclusive information can be obtained on the effect of GLP-1 by experiments with exendin (9-39) *in vivo*.

GLP-1 and its pronounced stimulation of insulin secretion have been known for approximately ten years (*Schmidt WE et al. Diabetologia* 1985; 28: 704-7; *Mojsov S et al.*

J Clin Invest 1987; 79: 619-9; Kreymann B et al. Lancet 1987; ii: 1300-4). Of all gastrointestinal hormones, GLP-1 is the most potent stimulator of insulin secretion and thus decisively contributes to the endocrine hormone effect (*Orskov C. Diabetologia* 1992; 35: 701-11). Therapeutic possibilities for GLP-1 in type II diabetes mellitus have  
5 been intensively investigated for several years by various research teams (*Nathan DM* et al. *Diabetes Care* 1992; 15: 270-6; *Gutniak M* et al. *N Engl J Med* 1992; 326: 1316-22; *Nauck MA* et al. *Diabetologia* 1993; 36: 741-4; *Holz GG* et al. *Nature* 1993; 361: 362-5; *Thorens B, Waeber G. Diabetes* 1993; 42: 1219-25; *Deacon CF* et al. *Diabetes* 1995; 44:  
10 1126-31; *Ritzel R* et al. *Diabetologia* 1995; 38: 720-5). The oral glucose tolerance tests conducted in the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice impressively elucidate the effects that the absence of the GLP-1 response has on postprandial blood glucose and serum insulin levels in these animals. The only surprise in these results that were expected is that there is a pronounced difference in blood glucose between male and female GLP-1R<sup>-/-</sup> mice. A sex-specific different action of GLP-1 has not been previously described. In future  
15 clinical studies on patients with type II diabetes mellitus, therefore, this possible difference should be monitored. It must also be clarified in animal experiments how this sex-specific difference in the GLP-1 effect is mediated. The curves for insulin concentration in serum with maximal stimulation of insulin secretion in control animals 30 minutes after oral glucose loading, which have been presented by *Drucker* and  
20 colleagues, supports earlier data that GLP-1 primarily stimulates the first phase of insulin secretion (*Weir CG* et al. *Diabetes* 1989; 38: 338-42; *Orskov C* et al. *Diabetes* 1993; 42: 658-61). The lack of effect of exogenous GLP-1 doses in oral glucose tolerance tests supported the complete absence of the GLP-1 receptor or another receptor that could mediate the biological GLP-1 effect, in the transgenic animals. Unfortunately,  
25 intravenous administrations of glucose with the same blood glucose effect were not conducted in parallel on the same GLP-1R<sup>-/-</sup> mice and on the control animals, along with the oral glucose tolerance tests. The endocrine hormone effect and its GLP-1-mediated component could be precisely quantified by such experiments.

There are hints from the research team of *Ensinck* and colleagues that GLP-1 not  
30 only decreases postprandially the glucose concentration in plasma via a stimulation of insulin secretion, but also stimulates glucose utilization via insulin-independent

mechanisms (*D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1994; 93: 2263-6; D'Alessio DA et al. Diabetes 1995; 44: 1433-7; D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1996; 97: 133-8*). Glucagon secretion, e.g., is also inhibited by GLP-1, for which reason lower blood glucose levels result (*Nauck MA et al. Diabetologia 1993; 36: 741-4; Ritzel R et al. Diabetologia 1995; 38: 720-5*). Drucker and colleagues thus postulated that glucose utilization must be pathological in the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice, independently of the route of glucose introduction, and observed the course of glucose concentration after intraperitoneal injection of glucose. The blood sugar was elevated for a longer period and was more pronounced in GLP-1R<sup>-/-</sup> mice than in normal animals also after intraperitoneal administration of glucose. The authors concluded that even when circumventing the insulin enteric pathway, the absent GLP-1 effect results in a pathological glucose utilization and thus insulin-independent influences of GLP-1 on glucose utilization must be important. However, this is only partially correct. Intraperitoneally applied glucose cannot in fact release GLP-1 directly in a physiological pathway via intraluminal stimulation mechanisms in the intestine, but it is not yet clear how carbohydrates stimulate the release of GLP-1. The GLP-1 release occurs primarily in the L cells of the distal part of the ileum (*Eissele R et al. Eur J Clin Invest 1992; 22: 283-91*), where oral glucose does not reach, since it is already resorbed in the proximal segments of the intestine. It has not yet been completely excluded that in addition to nerve stimulation by stretch stimuli in the proximal segments of the gastrointestinal tract, the glucose increase in the blood of the portal vein also leads to increased release of GLP-1. An increased glucose concentration also surges for a short time at least in the portal circulation due to the intraperitoneal administration of glucose, which corresponds to that of glucose given orally. Only the inhibiting effect of GLP-1 on the emptying of the stomach is avoided (*Willms B et al. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 327-32*) in the case of intraperitoneal glucose administration when compared to oral administration. Whether or not extra-pancreatic effects of GLP-1 (e.g., stimulation of glucose uptake in skeletal muscle or fatty tissue, stimulation of glycogen synthesis in the liver) (*Egan JM et al. Endocrinology 1994; 135: 2070-5; Villanueva-Penacarrillo ML et al. Diabetologia 1994; 37: 1163-6; D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1994; 93: 2263-6; D'Alessio DA et al. Diabetes 1995; 44: 1433-7*) play a role in glucose utilization can neither be clarified nor quantified with

the choice of intraperitoneal glucose administration selected by *Drucker* and colleagues. Investigations *in vitro* on the given tissues of mutant mice without the GLP-1 receptor and of normal controls would be necessary for this. Since the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice can be easily reproduced, these investigations can be conducted in future without problem.

5       The recently published, sensational findings of the research team of *Bloom*, which grants to GLP-1 an important role as a central mediator of satiety (*Turton MD et al. Nature* 1996; 379: 69-72), are considerably weakened by the investigations of GLP-1R<sup>-/-</sup> mice. First of all, these mice also have a normal body weight over a long period of time, and, secondly, their eating behavior is unremarkable after a period of fasting. Icv 10      administrations of GLP-1 were without effect in these animals, which demonstrates that the same "pancreatic" GLP-1 receptor is present in the CNS as in other organs. Autoradiographs with <sup>125</sup>I-labeled GLP-1 on brain sections of GLP-1R<sup>-/-</sup> mice showed that no other GLP-1 binding sites are additionally present in the CNS. It is obvious due 15      to these findings that a regulation of eating behavior and of body weight in no way occurs primarily by central GLP-1. It has been known for a long time that many neuropeptides play a role in the central regulation of ingestion of food (*Morley JE et al. Endocr Rev* 1987; 8: 256-87; *Lee MC et al. Neurosci Behav Rev* 1994; 18: 313-23). Cholecystokinin (CCK) (*Moran TH et al. Am J Physiol* 1993; 265: G219-23) and bombesin participate in the mediation of satiety, while, on the other hand, neuropeptide Y (NPY) and galanin 20      stimulate eating behavior (*Schick RR et al. Brain Res* 1991; 552: 232-9; *Schick RR et al. Am J Physiol* 1993; 264: R355-61). Up until now little has been known of the CNS interaction of these peptides. It could be pointed out for GLP-1, however, that it acts centrally via NPY-independent mechanisms (*Turton MD et al. Nature* 1996; 379: 69-72). Further, the product of the ob gene, leptin, appears to play an important role in the central 25      regulation of satiety (*Pelleymounter MA et al. Science* 1995; 269: 540-3; *Halass JL et al. Science* 1995; 269: 543-6; *Campfield LA et al. Science* 1995; 269: 546-9). In mice with excluded NPY gene, which, like the GLP-1R<sup>-/-</sup> mice, were otherwise not adipose and showed normal eating behavior, an increased leptin sensitivity could be observed (*Erickson JC et al. Nature* 1996; 381: 415-8). The leptin sensitivity has still not been 30      investigated for mice with excluded GLP-1 receptors. The certainly complex action and

interaction of GLP-1 with other neuromodulators in the CNS must be further clarified, and for this purpose, additional investigations in GLP-1R<sup>-/-</sup> mice would be meaningful.

#### Upshot

5       The present study supplies another piece of evidence for the importance of GLP-1 as an endocrine hormone. The pathological course of glucose concentration after oral or intraperitoneal administration of glucose in GLP-1R<sup>-/-</sup> mice underscores the influence of GLP-1 in the monitoring of glucose homeostasis and provides arguments for the fact that GLP-1 may have therapeutic potential for type II diabetes mellitus. In addition to these  
10      important results relative to the physiology of GLP-1, the present study again shows that "knockout" mice are useful experimental models, with a suitable experimental set-up, for investigating, in a targeted manner, the physiological effect of the absence of a protein.

## KOMMENTIERTES REFERAT

# GLP-1-Rezeptorgen »knockout« verursacht Glukoseintoleranz, aber keine Störung des Essverhaltens

GALLWITZ, B., und SCHMIDT, W. E.

## Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene

Scrocchi LA, Brown TJ, MacLusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ.

Nature Medicine 1996; 2: 1254-8

### ZUSAMMENFASSUNG

Das gastrointestinale Hormon Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) stimuliert postprandial die Insulinsekretion (Kreymanu B et al. Lancet 1987; ii: 1300-4). Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II verbessern exogene GLP-1-Gaben den postprandialen Glukosestoffwechsel (Nauck M et al. Diabetologia 1993; 36: 741-4). Ferner scheint GLP-1 nach neueren Arbeiten eine wichtige Rolle als zentraler Mediator der Sättigung zu spielen (Turton MD et al. Nature 1996; 379: 69-72). Da jedoch noch andere Peptide die Insulinsekretion und das Sättigungsverhalten beeinflussen, wurde von der Arbeitsgruppe von Drucker in der vorliegenden Arbeit an einem Mausmodell mit fehlendem GLP-1-Rezeptor die relative Wichtigkeit von GLP-1 als physiologischem Stimulator der Insulinsekretion und als zentralem Mediator des Fresfverhaltens untersucht.

Zunächst wurden Mäuse mit einer gezielten Ausschaltung des GLP-1-Rezeptorgens (GLP-1-Rezeptor «knockout», GLP-1R<sup>-/-</sup>) gezüchtet. Hierzu wurde ein Targeting-Vektor konstruiert, der verschiedene Exons des CLP-1-Rezeptors ersetzt. Die genomische DNA der transgenen Tiere zeigte eine komplette Ausschaltung des GLP-1-Rezeptorgens. Das so erzielte rekombinante GLP-1R<sup>-/-</sup>-Allel wurde mit der erwarteten Frequenz nach den Mendelschen Gesetzen an die nächste Generation weitergegeben, und es konnten so CLP-1<sup>-/-</sup>-Mausmutanten gezüchtet werden. Diese Mäuse sind lebensfähig, entwickeln sich normal und erscheinen phänotypisch völlig unauffällig. mRNA-Transkripte des GLP-1-Rezeptors wurden in Pankreas, Hypothalamus und Lunge, wo bei normalen Tieren der GLP-1-Rezeptor in hohem Maße exprimiert wird, nicht gefunden. Die histologische Struktur dieser Organe war komplett unauffällig.

Um die Bedeutung von GLP-1 für die Regulation des Blutzuckerspiegels zu untersuchen, wurden bei männlichen und weiblichen CLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen orale Glukosetoleranzteste durchgeführt. Bei diesen Mäusen fand sich im oralen Glukosetoleranztest eine pathologische Glukosetoleranz mit erhöhten Blutglukosewerten postprandial bis zwei Stunden nach Testbeginn. Auch die Nüchternglukosewerte waren bei den meisten Mäusen erhöht. Die Glukosetoleranzstörung war bei den männlichen Tieren ausgeprägter als bei den weiblichen.

Bei den gleichzeitig gemessenen Seruminsulinkonzentrationen zeigten die GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäuse vergleichbare Nüchternwerte gegenüber Kontrolltieren. 30 Minuten nach oraler Aufnahme der Glukose war bei den «Knockout»-Tieren die Insulinkonzentration im Serum jedoch um etwa ein Drittel vermindert. Die Werte nach einer Stunde waren bei CLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen und Kontrolltieren wieder gleich. Die parallel gemessenen Glukosetoleranzwerte waren bei beiden Tiergruppen während der oralen Glukosetoleranztests gleich.

Um zu zeigen, daß GLP-1 entscheidend an der Regulation der Blutglukosiekonzentration beteiligt ist, wurde normalen Mäusen und GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen Glukose auch intraperitoneal verabreicht. Auch bei dieser Glukosetozufuhr zeigten die transgenen Tiere eine pathologische Glukosetoleranz. Bei den männlichen Tieren war die Glukoseintoleranz, wie schon im oralen Glukosetoleranztest, stärker ausgeprägt.

Als Kontrollversuch, daß biologische Effekte von GLP-1 nicht durch andere Rezeptoren vermittelt werden, diente eine dritte Versuchsreihe, in der orale Glukosetoleranztests mit gleichzeitiger Gabe pharmakologischer Dosen von 100 µg GLP-1 durchgeführt wurden. Hier ließ sich bei normalen Kontrolltieren durch exogene GLP-1-Gabe im oralen Glukosetoleranztest der Blutzuckeranstieg unterdrücken. Bei GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte die GLP-1-Gabe keinen Effekt auf den Blutzuckerverlauf.

Da die Arbeitsgruppe von Bloom (Turton MD et al. Nature 1996; 379: 69-72) kürzlich postuliert hatte, daß GLP-1 im ZNS ein wichtiger Regulator der Sätti-

Anschrift der Kommentatoren: Dr. med. B. Gallwitz, Prof. Dr. med. W. E. Schmidt, I. Medizinische Klinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Schittenhelmstr. 12, 24105 Kiel

## KOMMENTIERTES REFERAT

gung sei, wurde das Fressverhalten der GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäuse unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Das Körpergewicht war bei diesen Tieren über einen Zeitraum von 24 Wochen mit dem von normalen Kontrolltieren identisch, was darauf hinweist, daß unter normalen Bedingungen GLP-1 sicher keine dominierende Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes hat. Bei nüchternen Tieren fand sich kein Unterschied in der Menge der aufgenommenen Nahrung. Das Fehlen des GLP-1-Rezeptors führt also weder zu einer Änderung des Körpergewichtes noch zu einer Änderung des Fressverhaltens. Intrazerebroventrikuläre (icv) Gaben von 5 µg GLP-1, die bei normalen Tieren die Futteraufnahme hemmen, hatten bei GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Effekt. Autoradiographien mit <sup>125</sup>I-GLP-1 zeigten, daß die transgenen Mäuse keine GLP-1-Rezeptoren exprimieren. Damit wurde gezeigt, daß pankreatische und zentrale GLP-1-Rezeptoren strukturell identisch sind und durch dasselbe Gen kodiert werden.

Die Autoren folgern aus ihren Experimenten, daß GLP-1 ein physiologisch wichtiges Inkretin ist und somit entscheidend zur postprandialen Stimulation der Insulinsekretion beiträgt. Aus den Versuchen, bei denen Glukose intraperitoneal gegeben wurde, ergibt sich, daß GLP-1, unabhängig von der Route der Zufuhr, die Glukosehomöostase entscheidend reguliert, möglicherweise sogar durch eine Stimulierung der peripheren Glukoseverwertung. Die Rolle von GLP-1 als zentralem Regulator der Sättigung scheint weniger wichtig zu sein als der periphere Effekt von GLP-1 als Stimulator der Insulinsekretion. Nach Meinung der Autoren unterstreichen die Experimente die Wichtigkeit von GLP-1 als physiologischem Regulator des Blutzuckerspiegels. Sie sehen daher Möglichkeiten, GLP-1 in Zukunft therapeutisch in der Diabetesbehandlung einzusetzen.

## KOMMENTAR

Anfang der neunziger Jahre wurde es durch neue molekulargenetische Methoden möglich, Tiermodelle mit gezielt ausgeschalteten Genen zu züchten (Tybulewicz V et al. Cell 1991; 65: 1153-63; Nagy A et al. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 8424-8; Nagy A, Rossant J. In: Gene targeting: A practical approach. Joyner AL (ed.). Oxford, Oxford Univ Press 1993; 147-78; Wurst W, Joyner AL. In: Gene targeting: A practical approach. Joyner AL (eds.). Oxford, Oxford Univ Press 1993; 33-61). Diese sogenannten „Knockout“-Mutanten sind seither zu wichtigen In-vivo-Untersuchungsmodellen geworden, um zu untersuchen, welche Folgen der Ausfall eines Proteins für den Organismus hat. Da für viele Hormonrezeptoren noch keine hochspezifischen Liganden mit ausschließlich rezeptorantagonistischer Aktivität verfügbar sind, werden zunehmend Tiere mit gezielt ausgeschalteten Rezeptorgenen gezüchtet. Etliche „Knockout“-Konstrukte führen jedoch zu letalen Mutationen, wodurch diese Technik begrenzt wird. In

der vorliegenden Arbeit ist es der Arbeitsgruppe von Drucker erstmals gelungen, eine Mausmutante zu züchten, die keinen pankreatischen GLP-1-Rezeptor besitzt. Sie konnte ferner zeigen, daß dieser Typ des GLP-1-Rezeptors alle wichtigen biologischen Funktionen von GLP-1 peripher und im ZNS vermittelt. Diese Mausmutante weist nicht nur einen unauffälligen Phänotyp auf, sondern sie entwickelt sich auch normal und ist voll lebensfähig. Sie eignet sich daher ausgezeichnet als Tiermodell für eine komplettete GLP-1-Resistenz, die durch ein Fehlen des GLP-1-Rezeptors bedingt ist. Bislang konnte als GLP-1-Rezeptorantagonist lediglich das Exendinfragment Exendin (9-39) (Göke R et al. J Biol Chem 1993; 268: 19650-5; Thorens B et al. Diabetes 1993; 42: 1678-82; Kolligs F et al. Diabetes 1995; 44: 16-9) verwendet werden, das jedoch auch als Antagonist am Rezeptor für Gastric inhibitory polypeptide (GIP) wirkt (Gremlich S et al. Diabetes 1995; 44: 1202-8). Da GIP auch die postprandiale Insulinsekretion stimuliert (Creutzfeldt W. Diabetologia 1979; 16: 75-85; Creutzfeldt W, Ebert R. Diabetologia 1985; 28: 565-73; Creutzfeldt W, Ebert R. In: The exocrine pancreas: Biology, pathobiology and disease. Go VL et al. (eds.). New York, Raven Press 1986; 333-46), kann durch Experimente mit Exendin (9-39) in vivo keine ausschließliche Aussage über die Wirkung von GLP-1 gemacht werden.

CLP-1 und seine ausgeprägte Stimulation der Insulinsekretion sind seit ungefähr zehn Jahren bekannt (Schmidt WE et al. Diabetologia 1985; 28: 704-7; Mojssov S et al. J Clin Invest 1987; 79: 619-9; Kreymann B et al. Lancet 1987; ii: 1300-4). Von allen gastrointestinalen Hormonen ist GLP-1 der potenteste Stimulator der Insulinsekretion und damit maßgeblich am Inkretineffekt beteiligt (Orskov C. Diabetologia 1992; 35: 701-11). Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus Typ II mit GLP-1 werden seit einigen Jahren intensiv von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Nathan DM et al. Diabetes Care 1992; 15: 270-6; Gutniak M et al. N Engl J Med 1992; 326: 1316-22; Nauck MA et al. Diabetologia 1993; 36: 741-4; Holz GG et al. Nature 1993; 361: 362-5; Thorens B, Wueber G. Diabetes 1993; 42: 1219-25; Deacon CF et al. Diabetes 1995; 44: 1126-31; Ritzel R et al. Diabetologia 1995; 38: 720-5). Die bei den GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführten oralen Glukosetoleranztests verdeutlichen eindrücksvoll, welche Auswirkungen das Fehlen der GLP-1-Antwort auf den postprandialen Blutglukose- und Seruminsulinverlauf bei diesen Tieren hat. Überraschend an den zu erwartenden Ergebnissen ist lediglich der ausgeprägte Unterschied im Blutglukoseverlauf bei männlichen und weiblichen GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen. Bislang war eine geschlechtspezifisch unterschiedliche Wirkung von GLP-1 nicht beschrieben worden. Bei zukünftigen klinischen Studien bezüglich Patienten mit Diabetes mellitus Typ II sollte daher auf diesen möglichen Unterschied geachtet werden. Ferner müßte im Tierexperiment geklärt werden, wodurch dieser geschlechtspezifische Unterschied in der GLP-1 Wirkung vermittelt

## KOMMENTIERTES REFERAT

wird. Die von Drucker und Mitarbeitern gezeigten Verläufe der Insulinkonzentrationen im Serum mit maximaler Stimulation der Insulinsekretion bei den Kontrolltieren 30 Minuten nach oraler Glukosebelastung untermauern frühere Daten, daß GLP-1 vor allem die erste Phase der Insulinsekretion stimuliert (Weir CG et al. Diabetes 1989; 38: 338-42; Orskov C et al. Diabetes 1993; 42: 658-61). Die Wirkungslosigkeit exogener GLP-1-Gaben bei oralen Glukosetoleranztests untermauerte bei den transgenen Tieren das völlige Fehlen des GLP-1-Rezeptors oder eines anderen Rezeptors, der biologische GLP-1-Effekte zu vermitteln mag. Leider wurden nicht parallel an den gleichen GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen und an den Kontrolltieren neben oralen Glukosetoleranztests auch intravenöse Glukosegaben mit gleicher Blutglukosewirkung vorgenommen. Durch diese Experimente könnte der Inkretineffekt und dessen GLP-1-vermittelter Anteil genau quantifiziert werden.

Aus der Arbeitsgruppe von Ensinck und Mitarbeitern gibt es Hinweise, daß GLP-1 nicht nur über eine Stimulation der Insulinsekretion postprandial die Glukosekonzentration im Plasma senkt, sondern auch über insulinunabhängige Mechanismen die Glukoseverwertung stimuliert (D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1994; 93: 2263-6; D'Alessio DA et al. Diabetes 1995; 44: 1433-7; D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1996; 97: 133-8). Durch CLP-1 wird z. B. auch die Glukagonsekretion gehemmt, woraus niedrigere Blutglukosespiegel resultieren (Nauck MA et al. Diabetologia 1993; 36: 741-4; Ritzel R et al. Diabetologia 1995; 38: 720-5). Drucker und Mitarbeiter postulierten daher, daß die Glukoseverwertung bei den GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen, unabhängig von der Art der Zuführung der Glukose, pathologisch sein müßte und beobachteten den Verlauf der Glukosekonzentration nach intraperitonealer Gabe von Glukose. Auch nach intraperitonealer Gabe von Glukose war der Blutzucker bei GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen länger und ausgeprägter erhöht als bei Normaltieren. Die Autoren schlossen daraus, daß auch bei Umgehung der enteroinsulinären Achse fehlende GLP-1-Wirkung in einer pathologischen Glukoseverwertung resultiert und daher insulinunabhängige Einflüsse von GLP-1 auf die Glukoseverwertung wichtig sein müßten. Dies ist jedoch nur teilweise richtig. Intraperitoneal applizierte Glukose kann zwar nicht direkt auf physiologischem Weg durch intraluminale Stimulationsmechanismen im Darm GLP-1 freisetzen, es ist jedoch bis jetzt unklar, wie Kohlenhydrate die GLP-1-Freisetzung stimulieren. Die GLP-1-Freisetzung findet vor allem in den L-Zellen des distalen Anteiles des Ileums statt (Eissele R et al. Eur J Clin Invest 1992; 22: 283-91), wohin orale Glukose nicht gelangt, weil sie in proximaleren Darmabschnitten bereits resorbiert wurde. Es ist bislang nicht völlig ausgeschlossen, daß neben nervaler Stimulation durch Dehnungsreize in proximalen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes auch der Glukoseanstieg im Portalvenenblut zur vermehrten Freisetzung von GLP-1 führt. Durch intraperitoneale Gabe von Glukose wird zumindest im Pfortalkreislauf kurzfristig auch eine erhöhte Glukosekonzentration anfluten, die der von oral gegebener Glukose entspricht. Lediglich der hemmende Effekt von GLP-1 auf die Magenentleerung (Willms B et al. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 327-32) wird bei intraperitonealer Glukosegabe im Vergleich zu oraler Gabe umgangen. Ob extrapankreatische Effekte von GLP-1 (z. B. Stimulation der Glukoseaufnahme in Skelettmuskel oder Fettgewebe, Stimulierung der Glykogensynthese in der Leber) (Egan JM et al. Endocrinology 1994; 135: 2070-5; Villanueva-Penacarillo ML et al. Diabetologia 1994; 37: 1163-6; D'Alessio DA et al. J Clin Invest 1994; 93: 2263-6; D'Alessio DA et al. Diabetes 1995; 44: 1433-7) bei der Glukoseverwertung eine Rolle spielen, läßt sich mit dem von Drucker und Mitarbeitern gewählten Ansatz der intraperitonealen Glukosegabe weder klären noch quantifizieren. Hierzu wären Untersuchungen *in vitro* an o. g. Geweben von mutanten Mäusen ohne GLP-1-Rezeptor und von normalen Kontrollen nötig. Da sich die GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäuse leicht vermehren lassen, sind diese Untersuchungen in Zukunft problemlos durchführbar.

Die kürzlich publizierten, aufsehenerregenden Befunde der Arbeitsgruppe von Bloom, die GLP-1 eine wichtige Rolle als zentralem Mediator der Sättigung zubilligen (Turton MD et al. Nature 1996; 379: 69-72), werden durch die Untersuchungen an GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen erheblich relativiert. Zum einen weisen diese Mäuse auch über einen langen Zeitraum ein normales Körpergewicht auf, zum anderen ist ihr Fressverhalten nach einer Nüchternperiode unauffällig. Iv-Gaben von GLP-1 waren bei diesen Tieren wirkungslos, was beweist, daß im ZNS der gleiche „pankreatische“ GLP-1-Rezeptor vorliegt wie in anderen Organen. Autoradiographien mit <sup>125</sup>I-markiertem GLP-1 an Hirnschnitten von GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten, daß keine anderen GLP-1-Bindungsstellen im ZNS zusätzlich vorliegen. Durch diese Befunde wird offensichtlich, daß eine Regulation des Fressverhaltens und des Körpergewichtes keineswegs zum größten Teil durch zentrales GLP-1 stattfindet. Es ist seit langem bekannt, daß viele Neuropeptide eine Rolle bei der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme spielen (Morley JE et al. Endocr Rev 1987; 8: 256-87; Lee MC et al. Neurosci Behav Rev 1994; 18: 313-23). So sind Cholezystokinin (CCK) (Moran TH et al. Am J Physiol 1993; 265: G219-23) und Bombesin an der Vermittlung der Sättigung beteiligt, wohingegen Neuropeptid Y (NPY) und Calanin das Fressverhalten stimulieren (Schick RR et al. Brain Res 1991; 552: 232-9; Schick RR et al. Am J Physiol 1993; 264: R355-61). Über die zentralnervöse Interaktion dieser Peptide ist bislang wenig bekannt. Für CLP-1 konnte jedoch gezeigt werden, daß es zentral über NPY-unabhängige Mechanismen wirkt (Turton MD et al. Nature 1996; 379: 69-72). Ferner scheint das Produkt des ob-Gens, Leptin, eine wichtige Rolle bei der zentralen Regulation der Sättigung zu spielen (Pelleymounter MA et al. Science 1995; 269: 540-3; Halass JL et al. Science 1995; 269: 543-6; Campfield LA et al. Science 1995; 269: 546-9). Bei Mäusen mit ausgeschaltetem NPY-Gen, die im übrigen wie die GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht adipös waren und normales Fressverhalten zeigten, ließ sich eine erhöhte Leptinsensitivität beobachten (Erickson JC et al. Nature 1996; 381: 415-8). Für die Mäuse mit ausgeschaltetem GLP-1-Rezeptogen ist die Leptinempfindlichkeit noch nicht untersucht. Die

## KOMMENTIERTES REFERAT

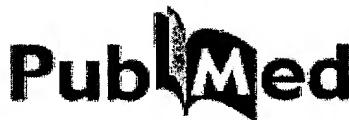
sicherlich komplexe Wirkung und Interaktion von GLP-1 mit anderen Neuromodulatoren im ZNS muß weiter geklärt werden, hierzu wären weitere Untersuchungen an GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen sinnvoll.

### FAZIT

Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Beweis für die Wichtigkeit von GLP-1 als Inkretinhormon. Die bei den GLP-1R<sup>-/-</sup>-Mäusen pathologischen Verläufe der Gluko-

sekonzentrationen nach oraler oder intraperitonealer Glukosegabe unterstreichen den Einfluß von GLP-1 bei der Kontrolle der Glukosehomöostase und liefern Argumente dafür, daß GLP-1 möglicherweise Potential für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II besitzt. Neben diesen wichtigen Ergebnissen zur Physiologie von GLP-1 zeigt die vorliegende Arbeit erneut, daß „Knockout“-Mäuse bei geeignetem experimentellem Ansatz brauchbare Versuchsmodelle sind, um gezielt die physiologischen Effekte des Fehlens eines Proteins zu untersuchen.

BEST Available COPY



National  
Library  
of Medicine NLM

My NC  
[Sign In] [Regis]

All Databases

PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

OMIM

PMC

Journals

Book

Search for 

Clear

 Limits   Preview/Index   History   Clipboard   Details

About Entrez

**Limits: Publication Date to 1998/01/31**
 Display    Abstract


Show: 20



Sort



Send to

Text

Text Version

 All: 1   Review: 0

Entrez PubMed

Overview

Help | FAQ

Tutorial

New/Noteworthy

E-Utilities

PubMed Services

Journals Database

MeSH Database

Single Citation Matcher

Batch Citation Matcher

Clinical Queries

LinkOut

My NCBI (Cubby)

Related Resources

Order Documents

NLM Catalog

NLM Gateway

TOXNET

Consumer Health

Clinical Alerts

ClinicalTrials.gov

PubMed Central

 1: J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997 Sep;52(5):B245-9.   Related Articles, Li

### The effects of GLP-1 on insulin release in young and old rats in the fasting state and during an intravenous glucose tolerance test

**De Ore K, Greig NH, Holloway HW, Wang Y, Perfetti R, Egan JM.**

Diabetes Section, National Institute on Aging, Baltimore, USA.

Glucose intolerance is a common feature of the aging process, and aging per se is an etiologic factor for Type II diabetes mellitus. To characterize the beta cell abnormalities that occur with aging, we looked at the serum glucose and insulin levels of six young (3-month) and six old (22-month) Wistar rats at 0, 2, 4, 7, 10, 15, 20, and 30 minutes after an intravenous glucose load (IVGTT, 0.5 g/kg glucose). We found that the fasting glucose and insulin levels were not significantly different between young and old rats. However, peak glucose levels were significantly higher in the old (349 +/- 10 mg/dl) compared to the young (250 +/- 7 mg/dl) animals ( $p < .0001$ ). Insulin levels in the young animals peaked at 2 minutes (859 +/- 171 pmol/l) with a quick return toward fasting levels by 7 minutes. The old animals had a delayed and blunted insulin response to glucose, achieving lower peak insulin levels (656 +/- 164 pmol/l) 10 minutes after the glucose load. As insulin levels are also positively modulated by incretin hormones, we quantitated the fasting insulin responses of young and old animals to .05, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.5 nmol/kg intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1), the most potent incretin known. Insulin responses were similar in both age groups, with maximum insulin responses seen at 0.4 nmol/kg. GLP-1, in conjunction with the IVGTT, restored the acute insulin response to glucose and increased the clearance of glucose in the old animals. It therefore appears that old animals have an impaired glucose-mediated insulin release but maintain their insulin responsiveness to GLP-1. This makes it a likely candidate in the treatment of Type II diabetes.

PMID: 9310073 [PubMed - indexed for MEDLINE]

 Display    Abstract


Show:

20



Sort



Send to

Text

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

[Department of Health & Human Services](#)

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)

Mar 14 2005 07:08:36



National  
Library  
of Medicine NLM



My NC  
[Sign In] [Regis]

All Databases

PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

OMIM

PMC

Journals

Book

Search for 

[Clear]

Limits   Preview/Index   History   Clipboard   Details

About Entrez

Limits: Publication Date to 1998/01/31

 Display  Abstract Show:

20



Sort



Send to

Text

Text Version

All: 1   Review: 0

Entrez PubMed

Overview

Help | FAQ

Tutorial

New/Noteworthy

E-Utilities

PubMed Services

Journals Database

MeSH Database

Single Citation Matcher

Batch Citation Matcher

Clinical Queries

LinkOut

My NCBI (Cubby)

Related Resources

Order Documents

NLM Catalog

NLM Gateway

TOXNET

Consumer Health

Clinical Alerts

ClinicalTrials.gov

PubMed Central

1: Eur J Endocrinol. 1997 Aug;137(2):127-31.

Related Articles, Li



**Reduced gastric inhibitory polypeptide but normal glucagon-like peptide 1 response to oral glucose in postmenopausal women with impaired glucose tolerance.**

**Ahren B, Larsson H, Holst JJ.**

Department of Medicine, Lund University, Malmo, Sweden.

**OBJECTIVE:** The gastrointestinal hormones, gastric inhibitory polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), are both released from the gut after oral glucose ingestion and stimulate insulin secretion. This study examined the release of these hormones in subjects with impaired glucose tolerance (IGT), which precedes the development of non-insulin-dependent diabetes. **DESIGN AND METHODS:** Six postmenopausal women with IGT, aged 59 years, underwent a 75 g oral glucose tolerance test and plasma levels of GIP and GLP-1 were determined regularly during the following 2 h. The results were compared with those in seven age- and weight-matched women with normal glucose tolerance (NGT). **RESULTS:** Basal plasma levels of GIP and GLP-1 were not different between the groups. In response to the oral glucose ingestion, plasma levels of both GIP and GLP-1 increased in both groups. The plasma GIP increase after glucose ingestion was, however, reduced in women with IGT. Thus, the GIP response as determined as the area under the curve in the 60 min after oral glucose was 34.8 +/- 3.2 pmol/l per min in women with IGT versus 56.4 +/- 7.8 pmol/l per min in those with NGT ( $P = 0.021$ ). In contrast, the GLP-1 response to oral glucose was not different between the groups. By definition, the glucose response to oral glucose was markedly increased in women with IGT, and the insulin response during the second hour after glucose ingestion was exaggerated. **CONCLUSIONS:** The GIP response to oral glucose is impaired in postmenopausal women with IGT, whereas the plasma GLP-1 response is not affected.

PMID: 9272099 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Best Available Copy

<input type="checkbox"/> Display	Abstract	<input checked="" type="checkbox"/>	Show:	20	<input type="checkbox"/>	Sort	<input type="checkbox"/>	Send to:	Text
----------------------------------	----------	-------------------------------------	-------	----	--------------------------	------	--------------------------	----------	------

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Department of Health & Human Services

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)

Mar 14 2005 07:08:36